

# 常春藤总 DNA 提取方法的改进

那冬晨, 邓俊敏

(山西师范大学 山西 临汾 041004)

**摘要:** 由于常春藤组织内含有较多的酚类和多糖类物质, 获得高质量的总 DNA 有一定难度。现以常春藤叶片为材料, 采用不同方法进行常春藤总 DNA 的提取, 并对提取方法进行了改进、优化, 有效去除了多糖类杂质的干扰。结果表明: CTAB 法、SDS 法及改进方法均可进行总 DNA 的提取, 但改进的方法优于常规 CTAB 法和 SDS 法, 所得的 DNA 无降解现象, 且无杂质污染。

**关键词:** 常春藤; DNA 提取; 多糖; 方法改进

**中图分类号:** S 687.3; Q 503 **文献标识码:** A **文章编号:** 1001-0009(2008)09-0162-02

常春藤(*Hedera nepalensis* var. *sinednsis* Rehd), 又名中华常春藤、爬树藤。为五加科(Araliaceae)常春藤属(*Hedera*)多年生常绿藤本攀援观叶植物<sup>[1]</sup>。茎具气生根, 幼枝被鳞片状柔毛, 叶革质, 深绿色, 有长柄。花期 9~11 月, 顶生聚伞形花序, 花瓣 5 枚, 花淡白绿色, 有雌雄之分, 具淡香。花后结有红橙色球形浆果, 果熟期为翌年 3~5 月<sup>[2]</sup>。常春藤原产于我国, 分布于亚洲、欧洲及美洲北部, 在我国主要分布在华中、华南、西南、甘肃和陕西等地<sup>[3,4]</sup>。常春藤既耐阴湿, 又耐寒冷<sup>[5]</sup>。既能生长在全光照环境中, 又能耐 7℃ 低温。对土壤要求不严, 喜温暖、湿润、疏松肥沃的中性或微酸性土壤。

快速提取高质量的基因组 DNA 是有效开展分子生物学研究的前提<sup>[6]</sup>。常春藤组织细胞内含有较多酚类化合物和多糖类物质, 较难获得高质量的基因组 DNA<sup>[7]</sup>。该试验利用 CTAB 法和 SDS 法进行了常春藤总 DNA 的提取, 并对提取方法进行改进, 有效地去除了多糖类等物质的干扰, 获得了高质量的 DNA。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验材料

盆栽常春藤。

### 1.2 所需试剂

2%CTAB 提取缓冲液、2%SDS 提取缓冲液、缓冲液 A (0.25 mol/L NaCl; 0.04 mol/L EDTA pH8.0; 0.2 mol/L Tris-HCl pH)、3 mol/L NaAc、4 mol/L LiCl、β-巯基乙醇、氯仿:异戊醇(24:1)、0.1×TE 缓冲液。

### 1.3 CTAB 法的改进

①在 1.5 mL 离心管中加入 1 mL 缓冲液 A, 冰浴, 加入液氮研磨的植物材料 50 mg, 迅速剧烈振荡混匀, 冰浴 20 min, 离心 7 min (7 000 r/min), 收集沉淀。②加入 2%CTAB 提取缓冲液 600 μL 和 β-巯基乙醇 20 μL, 迅速

振荡混匀, 65℃水浴 20 min, 期间不时缓慢颠倒离心管。③取出离心管冷却至室温, 加入等体积的氯仿:异戊醇 (24:1), 缓慢摇匀 15 min。离心 10 min (12 000 r/min), 取上清液, 转入另一离心管中。再重复抽提 2 次。④在上清液中加入等体积 4 mol/L 的 LiCl 溶液, 缓慢混匀, 加 1/2 倍体积预冷的无水乙醇, 混匀, 4℃过夜 (>20 h), 沉淀 RNA。⑤离心 10 min (12 000 r/min), 取上清液, 平均分装至 2 个新的离心管中。加 1/10 体积的 3 mol/L 的 NaAc, 混匀, 加入 2 倍体积预冷的无水乙醇, 缓慢摇匀, 4℃沉淀 3 h 或 -20℃沉淀 45 min。⑥离心 (12 000 r/min) 10 min, 弃上清, 加 75%乙醇洗涤 2~3 次, 除去残留的盐, 室温干燥至乙醇挥发, 加适量的 0.1×TE 溶解 DNA。

### 1.4 SDS 法的改进

①在 1.5 mL 离心管中, 加入 2% SDS 提取缓冲液 600 μL, 3 mol/L NaAc 溶液 400 μL (2/3 体积), β-巯基乙醇 20 μL, 冰浴。②加入液氮研磨的植物材料约 50 mg, 迅速振荡混匀, 冰浴 20 min, 期间缓慢颠倒离心管数次。③离心 10 min (12 000 r/min), 取上清液, 平均分装到 2 个新的离心管中, 加入等体积的氯仿:异戊醇 (24:1), 缓慢摇匀 15 min, 离心, 取上清液, 再重复抽提 2 次。④在上清液中加入等体积的 4 mol/L LiCl 溶液, 缓慢混匀, 加入 1/2 倍体积预冷的无水乙醇, 混匀, 4℃过夜 (>20 h), 沉淀 RNA。⑤离心 10 min (12 000 r/min), 取上清液, 平均分装到 2 个新的离心管中。加 1/10 体积的 3 mol/L NaAc, 混匀, 再加入 2 倍体积预冷的无水乙醇, 缓慢摇匀, 4℃沉淀 3 h 或 -20℃沉淀 45 min。⑥离心 (12 000 r/min) 10 min, 弃上清, 加 75%乙醇洗涤 2~3 次, 除去残留的盐, 室温干燥至乙醇挥发, 加适量的 0.1×TE 溶解 DNA。

## 2 结果与分析

### 2.1 常规方法

从图 1 看出, 常规 CTAB 和 SDS 法提取的 DNA, 带型不整齐, 有明显的“拖尾”现象, SDS 法尤为突出, 说明

第一作者简介: 那冬晨(1964), 女, 博士, 副教授, 现从事植物分子生物学研究工作。E-mail: 007nde@163.com.

收稿日期: 2008-03-22

DNA 样品中含有较多的多糖类等杂质, 质量较差, 不符合进一步相关研究的要求。SDS 法沉淀核酸时有黏多糖等杂质与之共沉淀, 呈淡黄绿色, 严重影响了 DNA 的质量。为了获得高质量的 DNA 样品, 除去多糖类等杂质的污染, 有必要对常规 DNA 提取方法进行改进。

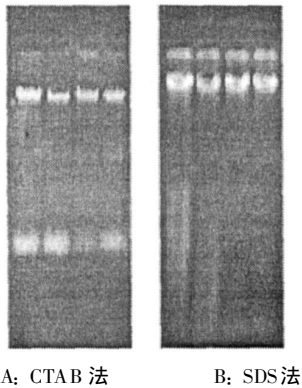


图 1 常规 DNA 提取方法所得常春藤总 DNA 的电泳结果

2.2 改进方法

现针对常规 DNA 提取方法中出现的问题, 对 DNA 提取方法进行了适当改进。结果表明, 改进后所得 DNA 样品的质量明显提高(如图 2)。

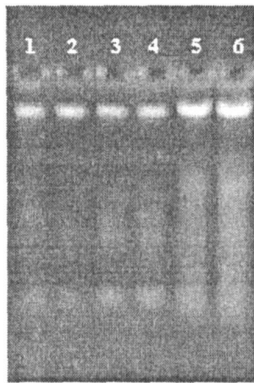


图 2 利用改进方法提取常春藤总 DNA 的电泳结果  
注: 1~4, 改进的 CTAB 法提取的常春藤总 DNA; 5~6, 改进的 SDS 法提取的常春藤总 DNA。

2.2.1 CTAB 法的改进 为了获得高质量的 DNA 样品, 对CTAB 法进行了改进。在常规操作步骤之前, 先

用事先预冷的缓冲液 A 处理液氮研磨的植物材料, 除去细胞中大部分多糖类等物质, 再进行常规操作, 有效除去了多糖类杂质, 获得了较高质量的纯净的 DNA (图 2)。

2.2.2 SDS 法的改进 常规 SDS 法提取常春藤总 DNA 得率较高, 但质量不理想(图 1B)。现对常规 SDS 法进行了改进, 在提取缓冲液中加 2/3 体积的 3 mol/L NaAc 溶液, 预冷, 加入液氮研磨的植物材料, 冰浴, 取上清, 再进行常规抽提步骤, 结果得到较高质量的 DNA (图 2)。从电泳结果看, DNA 条带清晰、整齐、无“拖尾”现象, 而且得率较高。表明改进后的 SDS 法能够有效去除植物材料中的多糖等物质, 获得了高得率、高质量的 DNA。

3 讨论

有些植物细胞中含有大量的酚类、多糖等物质, 影响 DNA 的提取, 所以不同植物材料、不同试验目的都需要对 DNA 提取方法进行适当的改进和优化, 实现对 DNA 的有效提取。以常春藤为材料进行多次重复试验, 得出结论: 对于细胞中多糖类物质含量高的植物材料, 总 DNA 的提取, 可采取事先去除多糖类物质的方法, 此步骤可单独进行, 也可以与破胞同时进行, 都能收到较好的结果。由于多糖类物质在高盐低温条件下呈不溶状态而沉淀, 所以在提取缓冲液中, 加入高盐溶液(冰浴), 离心, 多糖类物质就会随着变性的蛋白一起沉淀下来, 收集上清液再进行常规抽提, 即可得到纯净的 DNA。应该注意的是在 DNA 的提取过程中加入的植物材料不能太多, 否则多糖类物质很难去除干净。该试验也曾多次尝试了抽提后去多糖, 但效果不理想, 多糖类物质不能一次性有效地除净。

参考文献

[1] 张存旭, 杨锋利, 袁秀平. 常春藤离体快繁技术[J]. 浙江林学报 2005, 22(2): 241-245.  
[2] 李学增. 图说家居养花一室内植物[M]. 北京: 科学普及出版社 2004.  
[3] 李秀芬, 张德顺, 王小青, 等. 常春藤应用概述[J]. 山东林业科技 2002(3): 39-40.  
[4] 罗正荣. 普通园艺学[M]. 北京: 高等教育出版社, 2005.  
[5] 梁海永, 郑均宝, 王进茂, 等. 常春藤的组织培养[J]. 河北林果研究 1998.  
[6] 姜静. 分子生物学实验原理与技术[M]. 哈尔滨: 东北林业大学出版社, 2003.  
[7] 周延清. DNA 分子标记技术在植物研究中的应用[M]. 北京: 化学工业出版社 2005.

The Improvement Methods of Extraction Total DNA in Ivy

NA Dong-chen, DENG Jun-min  
(Shanxi Nomal University, Linfen Shanxi 041004 China)

**Abstract:** Because the phenols and polysaccharides in Ivy are rich, it is difficult to obtain high-quality total DNA from its tissues. In the paper, the total DNA of Ivy was extracted from its leaves, and the different extracting methods were compared. The extracting methods of total DNA of ivy were improved and optimized for clearing away polysaccharides effectively. The results showed that the CTAB method, the SDS method, and the improved methods can extract total DNA. But the improved methods were better than the conventional CTAB and SDS method, because they could obtain high-quality total DNA with less elimination and impurity.

**Key words:** Ivy; DNA extraction; Polysaccharides; Methods improvement